SCIENCE DU SOL - 1990 - Vol. 28, 3, pp. 223-236

Caractérisation par hydrolyse acide de l'azote des fractions organiques et organo-minérales d'un sol humifère

E. BARRIUSO (1)
F. ANDREUX (2)
J.-M. PORTAL (2)

RÉSUMÉ

La répartition des composés azotés dans les fractions organiques et organo-minérales d'un sol humifère a été étudiée par hydrolyse acide. On distingue l'azote des biomolécules (amino-acides, osamines), l'azote ammoniacal, l'azote hydrolysable non identifié et l'azote non hydrolysable. Les acides fulviques concentrent les composés les plus instables produisant des quantités importantes d'ammoniaque lors de l'hydrolyse acide : ils sont formés par des chaînes azotées très courtes (1 à 3 unités). L'azote organique de l'humine lié aux argiles est le plus stable et de nature protéique. Les acides humlques et les colloïdes organo-minéraux, obtenus par floculation saline des extraits humiques, concentrent respectivement les quantités les plus importantes des formes non identifiée et non hydrolysable de l'azote organique. Les teneurs en amino-acides des acides humiques et fulviques et des colloïdes organo-minéraux obtenus à pH≥12 sont supérieures à celles des mêmes fractions obtenues à pH≤10. L'augmentation du pH d'extraction, de pH≤10 à pH≥12, provoque la destruction des micro-agrégats. Dans ce sol, l'agrégation est liée à la présence d'acides fulviques riches en azote et de colloïdes organo-minéraux riches en fer et en aluminium. Des traceurs biologiques de l'activité microbienne ont été identifiés dans différentes fractions.

MOTS-CLÉS : composé humique - complexe organo-minéral - hydrolyse acide - azote organique - amino-acide.

ACID HYDROLYSIS CHARACTERIZATION OF NITROGEN IN ORGANIC AND ORGANO-MINERAL FRACTIONS OF A HUMUS-RICH SOIL

The distribution of nitrogen-containing compounds in the organic and the organo-mineral fractions of a humus-rich acid soil (Table I) was studied by acid hydrolysis. Biomolecular nitrogen (aminoacid and osamines), NH_4-N nitrogen, unidentified soluble nitrogen and non-hydrolyzable insoluble nitrogen were distinguished after acid hydrolysis (Fig. 1 & 2). The most unstable compounds which contained short chains (1 to 3 units) of hydrolyzable nitrogen were found in fulvic acids, while the most stable proteinaceous organic nitrogen was found in the humin bound to clay minerals. Humic acids and organo-mineral colloids (isolated from humic extracts by salt flocculation) respectively contained the highest quantities of non identified and non hydrolyzable nitrogen. The amino-acid contents of fulvic and humic acids, and organo-mineral colloids separated at pH≥ 12 were higher than in the equivalent fractions separated at pH≤10 (Fig. 3). The humins separated at pH≤10, but not those at pH≥12, were aggregated and the aggregation was associated mainly to nitrogen-rich fulvic acids and iron and aluminium organo-mineral colloids (Fig. 4). Biological markers of microbial activity of the humus-rich soil were identified.

KEY-WORDS : *humic compound - organo-mineral complex - acid hydrolysis - organic nitrogen - amino-acid.*

(1) Laboratoire des Sols INRA, Centre de Grignon, 78850 Thiverval-Grignon.
(2) Centre de Pédologie biologique, CNRS, B.P. 5, 54501 Vandœuvre.

INTRODUCTION

Dans certains sols acides de montagne, l'accumulation de matière organique s'accompagne d'une importante diminution du rapport C/N au cours de l'humification (BOUDOT, 1982 ; DUCHAUFOUR, 1983). La réorganisation de l'azote sous forme organique semble largement prédominer par rapport aux phénomènes de minéralisation. Ce comportement est étroitement lié à la nature de la litière végétale et surtout aux conditions pédoclimatiques. L'acquisition de renseignements sur l'azote organique devrait permettre d'élucider les voies d'incorporation de l'azote dans ces conditions bien particulières.

Pour ce faire, on a étudié la répartition de l'azote organique d'un sol acide de montagne à l'aide des techniques d'hydrolyse et de fractionnements physique et chimique. L'hydrolyse acide est l'une des principales méthodes utilisées pour accéder aux formes de l'azote organique (BREMNER, 1965 ; PARSONS et TINSLEY, 1975 ; JOCTEUR-MONROZIER et ANDREUX, 1981 ; STEVENSON, 1982). Les composés solubilisés par cette méthode comprennent de larges proportions d'amino-acides, osamines et d'ammoniaque, ainsi que de faibles quantités de bases puriques et pyrimidiques. En outre, des quantités variables de composés azotés, dits "non identifiés", sont mises en solution. Ils correspondent à l'azote "humique" *stricto sensu* et incluent des combinaisons complexes encore mal déterminées (ANDREUX *et al.*, 1971 ; JAMES, 1972). La quantité d'azote non identifié, ainsi que la proportion d'azote non hydrolysable, augmentent avec l'humification aux dépens des biomolécules azotées identifiables (JOCTEUR-MONROZIER, 1984 ; CALDERONI et SCHNITZER, 1984). La répartition des formes de l'azote organique constitue donc un critère d'évaluation du degré d'humification des matières organiques et, dans une certaine mesure, des voies de leurs transformations (JOCTEUR-MONROZIER et DUCHAUFOUR, 1986).

Le fractionnement chimique de la matière organique par des solvants alcalins est classiquement utilisé ; il permet de séparer des constituants organiques à différents degrés de polycondensation, cette polycondensation étant un critère du degré d'humification. Plus récemment, des techniques de fractionnement physique ont été appliquées aux sols (ANDREUX *et al.*, 1980). Celles-ci permettent une séparation des matières organiques non humifiées et humifiées ; la plupart des premières sont récupérées avec les fractions de granulométrie grossière, tandis que les secondes sont associées aux fractions de granulométrie plus fine. Enfin, l'utilisation des techniques chromatographiques (identification des composés biomoléculaires) permet la distinction des composés humiques et non humiques (JOCTEUR-MONROZIER, 1984) ; les premiers sont des produits de transformation et de condensation dont la structure chimique n'est plus identifiable, tandis que les composés non humiques sont directement apparentés à des biomolécules identifiables.

Cet ensemble de techniques a été utilisé pour la caractérisation de l'azote organique d'un sol acide de montagne. La structure micro-agrégée de ce sol est détruite au cours des extractions alcalines à pH élevé. Dans ces conditions, l'extraction des ciments organiques s'accompagne de la solubilisation de l'aluminium amorphe (BARRIUSO *et al.*, 1985) tandis que le fer amorphe, et la matière organique qui lui est associée, floculent à des vitesses de sédimentation correspondant à celles de particules de 30-50 µ (BARRIUSO *et al.*, 1984). La signification des différentes fractions récupérées sera discutée en fonction des voies d'humification caractéristiques de la pédogenèse de ce type de sol. La répartition des formes de l'azote et l'identification des biomolécules azotées dans chaque fraction permettra de mettre en évidence la localisation des différentes formes de l'azote organique en fonction de la nature minérale de la fraction considérée.

I. MATÉRIEL ET MÉTHODES

A) LE SOL

Le sol étudié est un sol brun ocre humifère (DUCHAUFOUR, 1983), Umbric Dystrochrept (SOIL TAXONOMY), de la Sierra de la Demanda (province de Burgos, Espagne). Il est à 1 900 m d'altitude, sur des schistes chloriteux et sous pelouse subalpine à Ericacées. Les horizons A12 (3,1% de carbone et 0,28% d'azote) et (B) (2,2% de carbone et 0,17% d'azote) ont été prélevés à la fin de l'été, séchés à l'air et tamisés à 2 mm.

B) EXTRACTION ALCALINE ET FRACTIONNEMENT

L'horizon A12 a été soumis à deux types d'extractions alcalines en parallèle (BARRIUSO *et al.*, 1984, 1985). Dans la première, le sol est maintenu à pH 10 par addition sous contrôle pH-métrique de NaOH dilué (extraction pH≤10). Dans la seconde, l'extraction est faite avec NaOH 0,1 N (concentration constante), le pH final d'extraction est alors supérieur à 12 (extraction pH≥12).

Les résidus insolubles en milieu alcalin (humines) sont fractionnés par sédimentation. Au cours de la remise en suspension dans l'eau des humines obtenues après extraction à pH≥12, on observe la présence de gels floculés sédimentant à une vitesse correspondant à celle de particules de taille 30-50 µm. Cette fraction concentre le fer amorphe du sol (BARRIUSO *et al.*, 1984) et est appelée "Colloïdes ferriques" (CFE). Elle est très nettement distincte de l'humine associée aux constituants minéraux fins (0-5 µm), appelée "Humine argileuse" (HAR). En revanche, après extraction à pH≤10, lors de la sédimentation de l'humine, il n'y a pas floculation des gels et le fer amorphe reste associé aux constituants minéraux fins (0-5 µm); cette humine est appelée "Humine agrégée" (HAG).

Dans les extraits alcalins, on sépare les fractions notées "Colloïdes organo-minéraux" (COM), par floculation saline avec du KCl N, puis les acides humiques (AH) et les acides fulviques (AF) par précipitation des premiers à pH 1,5. Dans les solutions d'acides fulviques, il est possible de séparer une fraction qui flocule à pH 7, négligeable dans les extraits à pH≤10, mais très importante après extraction à pH≥12 ; dans ce cas, elle concentre l'aluminium amorphe du sol (BARRIUSO *et al.*, 1985) et est appelée "Colloïdes alumineux" (CAL).

Toutes les fractions séparées sont dialysées contre de l'eau distillée, les acides humiques et fulviques sont décationisés sur colonne de résines cationiques (H^+) (BARRIUSO *et al.*, 1985). Les fractions ainsi purifiées sont lyophilisées.

C) TECHNIQUES ANALYTIQUES

Les fractions et le sol total sont hydrolysés avec HCl 3 N à reflux en s'inspirant de la technique séquentielle décrite par JANEL *et al.* (1979). Après 60 minutes d'hydrolyse, l'hydrolysat est séparé du résidu solide par centrifugation. Ils sont tous deux réhydrolysés séparément jusquà 24 heures. En fin d'hydrolyse, l'azote du résidu insoluble, ou "*azote non hydrolysable*", est dosé avc un microanalyseur CHN Carlo Erba 1106. Dans les hydrolysats, l'azote solubilisé, ou "*azote hydrolysable*", est dosé par la méthode Kjeldahl. Ensuite, les principales formes de l'azote hydrolysable sont quantifiées : "*l'azote ammoniacal*" ($N\text{-}NH_4$) par distillation à pH 8,8 en présence de tampon borate, "*l'azote α-aminé et ammoniacal*" ($N\alpha$ et $N\text{-}NH_4$) par spectrophotocolorimétrie à l'aide de ninhydrine (MOORE et STEIN, 1954), "*l'azote des osamines*" (Nosa) par spectrophotocolorimétrie en présence de p-diméthylamino benzaldéhyde après condensation des osamines avec l'acétylacétone (ELSON et MORGAN, 1933) et "*l'azote non identifié*" calculé par différence entre l'azote hydrolysable et la somme $N\text{-}NH_4 + N\alpha$ + Nosa.

Comparativement au dosage colorimétrique, les principaux amino-acides sont dosés individuellement par chromatographie en phase gazeuse des esters butyl N-trifluoroacétyl correspondants (JOCTEUR-MONROZIER, 1984) ; l'identification des pics chromatographiques est réalisée par comparaison des temps de rétention et par injection simultanée des échantillons et des étalons (chromatographe Girdel 3000, colonne capillaire en pyrex OV-17, 28 m, détecteur à ionisation de flamme).

D) DÉFINITION DES PARAMÈTRES DE L'HYDROLYSE

Généralement, la solubilisation de l'azote hydrolysable et des formes ammoniacale et α-aminée suit une cinétique telle que celle présentée dans la figure 1. Comme dans un travail précédent (BARRIUSO *et al.*, 1987), ce type de cinétique peut être décrit par une équation empirique intégrée de la forme :

$$[P]_t / [P]\infty = (K.\,t) / (1 + K.\,t)$$

où $[P]_t$ est la concentration des produits d'hydrolyse au temps t, $[P]\infty$ la concentration des produits totaux hydrolysés et K la constante de vitesse. Si on admet que pour tous les composés $t/[P]_t = f(t)$ est linéaire et que le temps final d'hydrolyse est de 24 h, on obtient :

$$K = 1/t \left| \frac{[P]\,24}{[P]_t} - 1 \right|$$

Avec t = 60 minutes et les concentrations d'azote hydrolysé, d'azote α-aminé et d'azote ammoniacal exprimées en pour cent de l'azote total, on peut calculer respectivement les constantes de vitesse d'hydrolyse KNh, KNα et KN-NH_4, exprimées en min^{-1}.

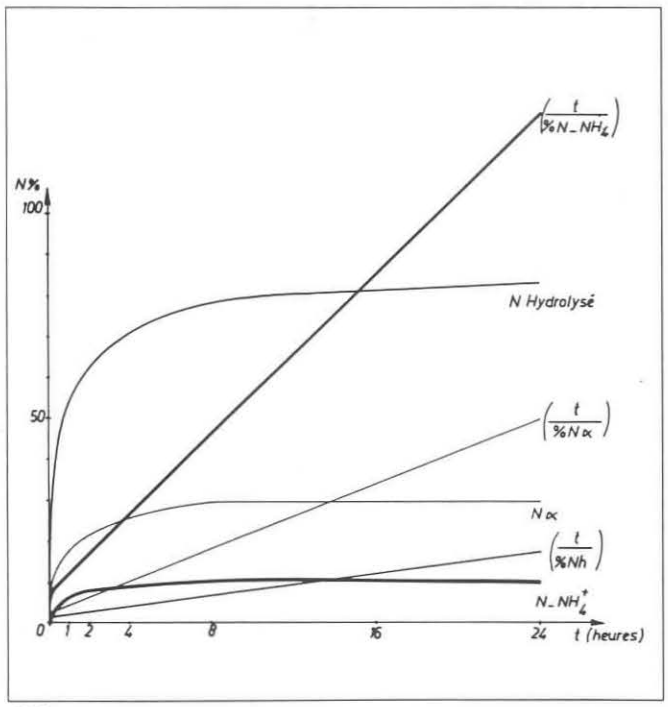


Figure 1 :

Cinétiques d'hydrolyse de l'azote total (N hydrolysé, Nh), α-aminé (Nα) et ammoniacal (N-NH_4).

Hydrolysis kinetics of total nitrogen (Nh), α-amino(Nα) and ammonia (N-NH_4).

Pour les fractions acides fulviques et colloïdes alumineux, totalement solubles au départ de l'hydrolyse, mais conduisant à la formation d'un précipité lors de l'hydrolyse, les constantes de vitesse ont été calculées à partir des dosages faits sur les hydrolysats récupérés après 2 et 24 heures.

L'hydrolyse séquentielle permet la définition empirique d'un "*azote α-aminé et ammoniacal résistant à l'hydrolyse*" (NR), défini comme le pourcentage d'azote hydrolysable non identifié après une heure d'hydrolyse et conduisant à des formes identifiées (azote α-aminé et ammoniacal), après 24 heures d'hydrolyse :

$$NR = (N\alpha + N\text{-}NH_4)\ 24 - (N\alpha + N\text{-}NH_4)\ 1$$

Ce calcul repose sur l'hypothèse structurale schématisée dans la figure 2. Ceci permet, en outre, l'estimation de la longueur moyenne des chaînes hydrolysables (LN), exprimée en nombre de groupements aminés :

$$LN = (NR + N\alpha 1) / N\alpha 1$$

où on suppose que Nα1 correspond aux amino-acides N-terminaux des chaînes peptidiques linéaires hydrolysables et NR aux autres amino-acides inclus dans ces chaînes.

E) EXPLOITATION DES RÉSULTATS

Pour aider à l'interprétation des résultats et faciliter leur présentation synthétique, une analyse en composantes principales sur l'ensemble des données a été réalisée. L'analyse a été effectuée sur les données centrées réduites à l'aide du logiciel STAT-ITCF (version 1987). Seules sont présentées la projection du nuage vectoriel de l'ensemble des variables et des observations sur le plan défini par les deux premiers axes résultant de l'analyse, et la localisation des variables et des observations dans le cercle des corrélations.

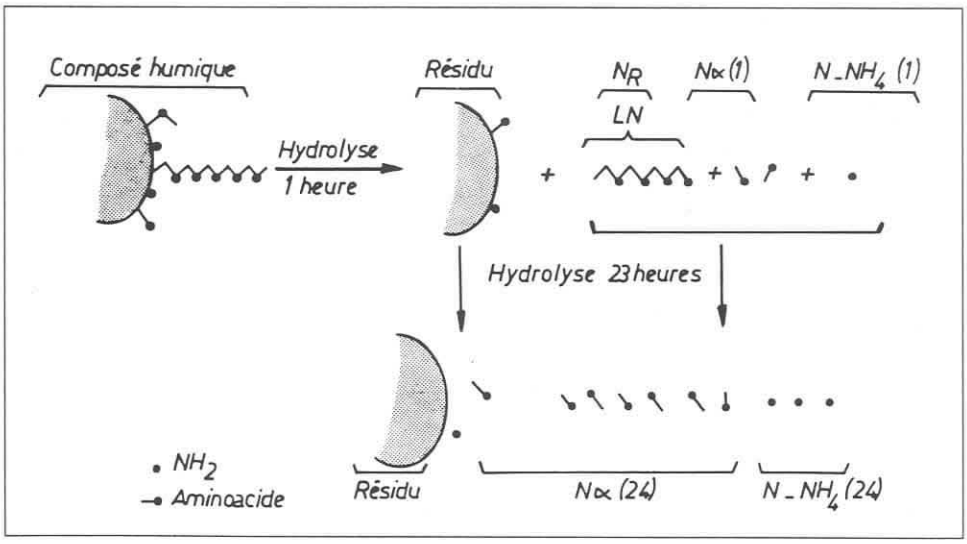


Figure 2 : Schéma des hypothèses structurales utilisées pour le calcul des paramètres hydrolytiques : azote hydrolysable résistant (NR) et longueur des chaînes hydrolysables (LN).
Diagram of structural hypotheses used to calculate the hydrolytic parameters : resistant hydrolyzable nitrogen (NR) and length of hydrolyzable chains (LN).

II. RÉSULTATS

A) RÉPARTITION DE L'AZOTE ORGANIQUE DU SOL

L'humine agrégée (HAG) séparée à pH 10 contient près de 40% de l'azote organique du sol (Tableau I). Les fractions non extractibles à pH 12 ont une teneur en azote plus faible, récupérée préférentiellement sous forme d'acides fulviques et de colloïdes alumineux. La part de ces derniers augmente de l'horizon A12 à l'horizon (B). 14 à 21% de l'azote organique sont inclus dans les acides humiques (AH), 7 à 13% dans les colloïdes organo-minéraux (COM).

Tableau I : Répartition de l'azote organique dans les fractions organiques et organo-minérales des horizons A12 et (B). résultats exprimés en pour cent de l'azote total de l'horizon.
Organic nitrogen distribution in organic and organo-mineral fractions of A12 and (B) horizons. Results in percent of total nitrogen of the A12 and (B) horizons.

Extraction pH ≥12	Humine >50µm	HAR	CFE	COM	AH	CAL	AF
A12	22	10	12	9	21	11	15
(B)	13	11	14	7	14	19	22
Extraction pH ≤10	Humine>50 µm	HAG		COM	AH	AF	
A12	24	37		10	19	10	
(B)	17	38		13	15	17	

(Signification des abréviations dans le texte)

B) CINÉTIQUES D'HYDROLYSE DES COMPOSÉS AZOTÉS

La solubilisation des composés azotés par hydrolyse acide est une réaction rapide. L'azote organique associé à l'humine argileuse (HAR) séparée à pH 12 s'hydrolyse le plus lentement (Tableau II). Généralement, l'azote des fractions obtenues après extraction à pH 10 présente des constantes de vitesse d'hydrolyse (KNh) plus élevées que celui des fractions équivalentes séparées à pH 12.

Dans la figure 3 sont présentés les résultats des cinétiques d'hydrolyse des fractions. L'apparition d'azote α-aminé et ammoniacal se fait fondamentalement à partir des oligomères solubilisés dès le début de l'hydrolyse. Ceci se traduit par des constantes de vitesse KNα et KN-NH_4 inférieures aux KNh correspondantes (Tableau II). L'azote α-aminé et l'azote ammoniacal sont libérés lentement dans les fractions où les constituants organiques semblent être sous forme de chaînes azotées longues (la longueur des chaînes étant estimée par le paramètre LN). C'est le cas de l'humine argileuse (HAR) et des colloïdes organo-minéraux (COM). Par contre, l'hydrolyse de ces formes de l'azote est beaucoup plus rapide dans les fractions avec des chaînes azotées courtes, acides fulviques notamment. Dans les fractions obtenues après traitement du sol à pH 10, l'azote est inclus dans des oligomères hydrolysables dont les longueurs de chaînes sont uniformes, avec des valeurs de LN voisines de 4 unités. L'augmentation du pH d'extraction provoque l'obtention de fractions avec des valeurs de LN très différentes : on distingue des composés à chaînes courtes, acides fulviques et humiques (AF et AH), colloïdes ferriques et alumineux (CFE et CAL), et des composés à chaînes plus longues, associés à l'humine argileuse (HAR) et aux colloïdes organo-minéraux (COM).

Tableau II : Paramètres hydrolytiques des fractions organoques et organo-minérales de l'horizon A12.

Hydrolytic parameters of the organic and organo-mineral fractions of the A12 horizon.

Extraction pH ≥ 12	HAR	CFE	COM	AH	CAL	AF
KNn	0,56	1,65	1,04	2,41	nc	5,48
KNa	3,34	5,48	5,13	5,05	nc	nc
KNh-NH_4	1,88	1,73	0,97	1,45	1,41	5,14
NR	27	25	29	18	17	13
LN	8,3	3,0	5,9	2,1	2,1	1,7

Extraction pH ≤ 10	HAG	COM	AH	AF
KNh	0,74	4,53	0,60	20,2
KNα	4,55	6,82	9,52	nc
KNh-NH_4	1,54	1,30	1,56	4,41
NR	36	22	21	9
LN	4,6	4,2	3,8	1,5

KNh, KNα,KNh-NH_4 : constantes de vitesse d'hydrolyse, 100 min^{-1}
NR : azote hydrolysable résistant, % de l'azote total
LN : longueur des chaînes hydrolysables
nc : non calculable

Ces différences, traduites en termes de résistance à l'hydrolyse, conduisent à des valeurs croissantes de l'indice NR dans l'ordre suivant :

AF - pH10<AF - pH12<CAL<AH - pH12<AH - pH10<COM - pH10<CFE<HAR<COM - pH12<HAG

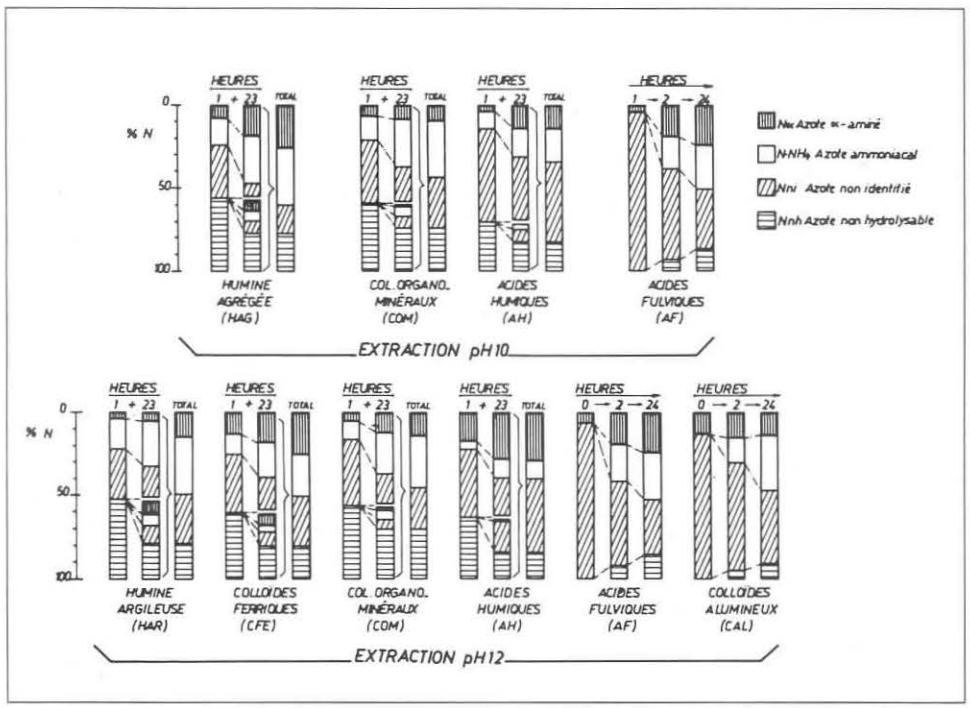
C) RÉPARTITION DES FORMES CHIMIQUES DE L'AZOTE

Environ 10 à 30% de l'azote de l'ensemble des fractions ne sont pas hydrolysables. Dans les hydrolysats, l'azote ammoniacal représente environ 30%, sauf pour les acide-shumiques où il n'atteint que 11 à 16% ; l'azote α-aminé varie selon les fractions entre 10 et 30% ; l'azote des osamines est compris entre 1 et 10% ; 10 à 40% de l'azote des différentes fractions sont inclus dans des structures moléculaires non identifiées (Tableau III). L'hydrolyse des acides fulviques et des colloïdes alumineux provoque l'apparition d'un précipité contenant de 9 à 13% de leur azote qui correspond à l'azote non hydrolysé de ces fractions (Tableau III).

La figure 4 est le résultat d'une analyse en composantes principales effectuée sur l'ensemble des données obtenues pour toutes les fractions. C'est la projection du système sur le plan défini par les axes des deux premières composantes. Cette analyse aide à l'inter-

Figure 3 - Résultats des cinétiques d'hydrolyse des fractions organiques et organo-minérales (à 1 heure et 24 heures) avec identification des différentes formes de l'azote.

Results of hydrolysis kinetics of organic and organo-mineral fractions with identification of nitrogen forms.



prétation comparative de la répartition des formes de l'azote (Tableau III), des paramètres d'hydrolyse (Tableau II) et du dosage individuel des amino-acides dans les fractions (Tableau IV). Dans la figure 4, après observation de la localisation des fractions et des projections des variables, on constate que l'axe horizontal, correspondant au premier axe défini par l'analyse, est étroitement lié à la solubilité des composés humiques dans les solvants alcalins, tandis que l'axe vertical, ou deuxième axe défini par l'analyse, est surtout en relation avec la composition des fractions, notamment avec leur teneur en azote α–aminé. Ces deux axes expliquent respectivement 33,3 et 25,7% de la variance totale du système. Le long de l'axe horizontal, l'azote non hydrolysable et la longueur des chaînes azotées (LN) diminuent, l'azote non hydrolysable non identifié et certains amino-acides (phénylalanine, acides aspartique et glutamique) augmentent. L'axe horizontal permet de distinguer clairement les fractions alcalino-solubles, acides fulviques et acides humiques, des fractions de l'humine. L'axe vertical différencie essentiellement les fractions de l'humine, sa fraction agrégée se détachant du reste. Ceci est dû à sa teneur élevée en amino-acides, glycine et alanine surtout, mais aussi proline, sérine, lysine et méthionine (Tableau IV). A la partie inférieure de l'axe vertical se trouvent les colloïdes organo-minéraux (COM), caractérisés par leur forte teneur en osamines.

Les amino-acides des acides fulviques se caractérisent par des proportions élevées en amino-di-acides, acides aspartique et glutamique, ainsi que par des amino-acides non protéiques, acide α, ε-diaminopilémique et citrulline.

Tableau III : Répartition des différentes formes de l'azote organique dans les fractions organiques et organo-minérales de l'horizon A12. Résultats exprimés en % de l'azote de chaque fraction.

Distribution of organic nitrogen forms in organic and organo-mineral fractions of the A12 horizon. Results in percent of nitrogen in each fraction.

Extraction pH ≥ 12	HAR	CFE	COM	AH	CAL	AF
α-aminé	16	23	17	29	15	24
Amino-acide non α-aminé	2	3	2	4	2	8
Osamines	3	6	10	1	5	5
Ammoniacal	32	27	29	11	33	29
Non identifié	25	21	11	39	36	20
Non hydrolysé	21	20	32	16	9	13

Extraction pH ≤ 10	HAG	COM	AH	AF
α-aminé	32	10	18	21
Amino-acide non α-aminé	7	1	4	4
Osamines	2	7	1	6
Ammoniacal	28	33	16	25
Non identifié	8	23	42	30
Non hydrolysé	23	26	19	13

L'hydrolyse des acides humiques solubilise des quantités importantes d'azote non identifié, environ 40% (Tableau III). Leur composante α-aminée se caractérise, comme pour les acides fulviques, par l'importance des acides aspartique et glutamique, mais la proportion de ce dernier diminue par rapport aux acides fulviques (Tableau IV). Les teneurs en amino-acides des acides humiques extraits à pH 12 sont supérieures à celles des acides humiques extraits à pH 10. Ceci est en partie dû à l'augmentation de la phénylalanine et de la lysine.

Les colloïdes organo-minéraux concentrent les quantités les plus importantes d'osamines et des formes non hydrolysables de l'azote (Tableau III). Leur forte teneur en osamines contraste ave celle des acides humiques, fraction dont la méthode de séparation est pourtant très proche.

Dans la fraction agrégée de l'humine, 8% seulement de l'azote restent non identifiés et 32% correspondent à des composés α-aminés, valeur maximale observée. Outre les amino-acides caractéristiques déjà mentionnés, la citrulline s'accumule dans cette fraction ; mais après extraction à pH 12, cet amino-acide n'est plus associé à l'humine et se trouve préférentiellement dans les acides fulviques.

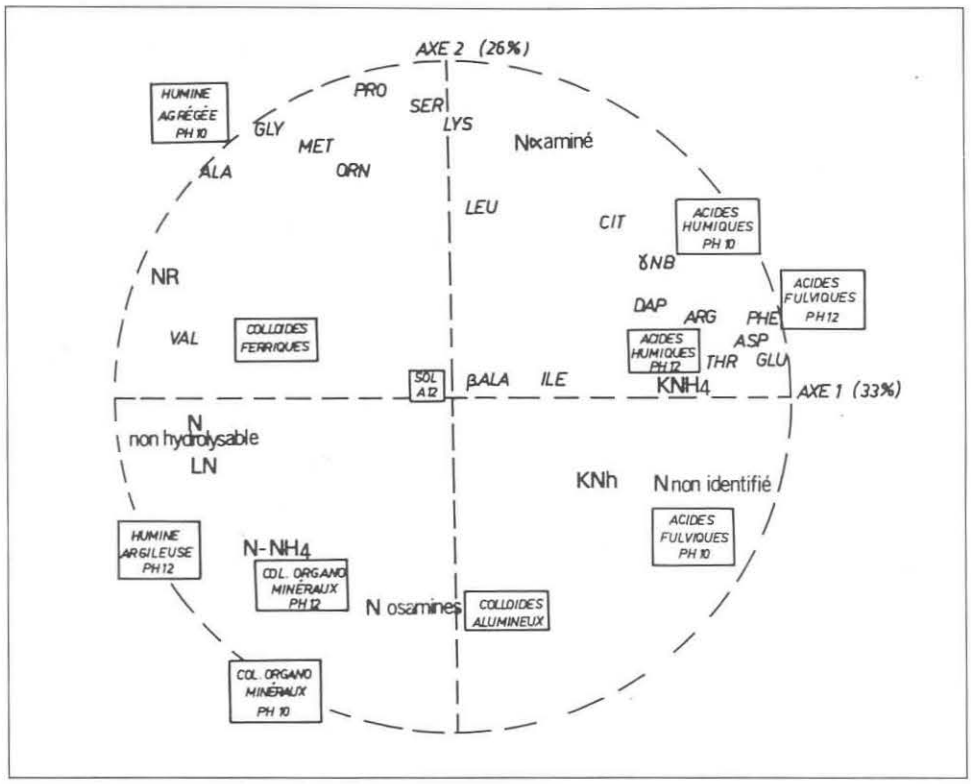


Figure 4 : Analyse en composantes principales des résultats d'hydrolyse (formes de l'azote, paramètres hydrolytiques et identification des amino-acides) des différentes fractions de l'horizon A12 : projection sur le plan défini par les axes de deux premières composantes et localisation des variables dans le cercle de corrélations.

Principal component analysis of hydrolysis data (nitrogen forms, hydrolytic parameters and amino-acids) for the organic and organo-mineral fractions of the A12 horizon.

III. DISCUSSION

La récupération des différentes fractions en fonction du pH d'extraction peut être interprétée à l'aide du modèle d'organisation structurale proposé par CHASSIN (1979). Les acides fulviques et humiques représentent, au niveau des micro-agrégats du sol, des couches organiques superficielles adsorbées sur d'autres constituants organiques ou minéraux par des liaisons de faible énergie. Ils sont facilement dispersables à des pH modérés, tandis que la matrice du micro-agrégat est conservée et récupérée dans ce que l'on a appelé l'humine agrégée. Celle-ci est détruite par l'action des agents d'extraction à pH plus élevés, ce qui provoque l'individualisation des agents de cimentation : colloïdes de fer et d'aluminium amorphes (CFE et CAL) et acides fulviques fortement azotés (BARRIUSO *et al.*, 1984). Dans ces ciments, qui concentrent 30% de l'azote du sol, on reconnaît des amino-acides tels que les acides glutamique et diaminopimélique et la citrulline, indicateurs d'une origine bactérienne (JOCTEUR-MONROZIER, 1984).

Tableau IV : Répartition des amino-acides dans les fractions organiques et organo-minérales de l'horizon A12 et dans le sol non fractionné. Résultats exprimés en µ-mol d'amino-acide par gramme de carbone de chaque fraction.

Amino-acid distribution in fractions of A12 horizon and in the soil. Results in µ-mol of amino-acid per gram of carbon in each fraction.

Extraction pH≥12	Sol	HAR	CFE	COM	AH	CAL	AF
Glycine	270	291	296	241	257	204	216
Alanine	195	221	271	162	137	104	115
Valine	16	63**	80**	27*	nd	35**	27*
Leucine	54	48	65	47	71	13	51
Isoleucine	20	24	34*	26	30*	9	30*
Proline	63	51	67	14	80	23	64
Phénylalanine	76	nd	8	nd	125**	65	171**
Sérine	73	59	67	75	73	36	78
Thréonine	49	43	42	45	67	23	67
Méthionine	tr	5	5	nd	nd	8	nd
Ac. glutamique	83	44	56	65	140*	110	185**
Ac. aspartique	132	122	157	209*	299**	155	242**
Lysine	38	22	28	40	51	34	41
Arginine	tr	nd	3	nd	8	11	20
Ornithine	7	nd	6	nd	7	tr	tr
Citrulline	8	tr	nd	tr	21**	nd	135**
Acide α, ε-Diaminopimélique	7	2	4	nd	2	2	20**
ß-Alanine	50	34	61	59	50	17	40
Acide γ-aminobutirique	6	1	1	4	7	7	7

Extraction pH≤10	Sol	HAG	COM	AH	AF
Glycine	270	696**	179	267	174
Alanine	195	462**	149	139	143
Valine	16	73**	30*	nd	25*
Leucine	54	53	33	59	30
Isoleucine	20	12	18	22	19
Proline	63	175**	36	68	43
Phénylalanine	76	8	nd	80	42
Sérine	73	112	38	87	52
Thréonine	49	28	37	72	58
Méthionine	tr	35**	nd	4	nd
Ac. glutamique	83	65	42	139*	161*
Ac. aspartique	132	112	98	285**	226*
Lysine	38	66*	9	25	33
Arginine	tr	2	nd	9	tr
Ornithine	7	11	4	3	3
Citrulline	8	58**	4	40**	27**
Acide α, ε-Diaminopimélique	7	8	2	4	15**
ß-Alanine	50	30	34	49	38
Acide γ-aminobutirique	6	6	1	9	4

tr : traces - nd : non détecté

* - ** : accumulation relative (>50%, >100%) par rapport à la teneur de chaque amino-acide de l'horizon A12 non fractionné

L'extractibilité de l'azote, en particulier des amino-acides, augmente avec le pH, comme cela a déjà été montré par BUTLER et LADD (1969) pour des micro-organismes. Au cours des extractions alcalines, la soude 0,1 N peut provoquer l'hydrolyse partielle des peptidoglycanes bactériens avec solubilisation des protéines des parois cellulaires (SCHLEIFER et KANDLER, 1972 ; ARCHIBALD *et al.*, 1969), voire même la lyse cellulaire (BRUCKERT et KILBERTUS, 1980).

En général, les acides fulviques se caractérisent par l'accumulation relative des aminoacides non protéiques, produits intermédiaires du métabolisme des micro-organismes et constituants de leur structure pariétale. Les acides fulviques concentrent les quantités les plus importantes de biomolécules ; celles-ci sont organisées en chaînes azotées très courtes, chimiquement instables et formant rapidement de l'ammoniaque par hydrolyse acide.

Dans les fractions de l'humine, en particulier dans la fraction argileuse séparée à pH 12 (HAR), se concentrent la glycine et l'alanine. Ces deux amino-acides prédominent dans les cellules bactériennes et tendent à s'accumuler au cours de la biodégradation des résidus végétaux (WAGNER et MUTATKAR, 1968 ; LOWE, 1973 ; MARUMOTO *et al.*, 1974) ; dans ce sens, ils peuvent être considérés comme traceurs de la composante microbienne de l'humine, bien que leur origine végétale partielle ne puisse pas être écartée.

La production d'ammoniaque au cours de l'hydrolyse acide semble être en rapport avec la teneur des minéraux des différentes fractions, ce qui pourrait confirmer la désamination due aux argiles évoquée par PARSON et TINSLEY (1975). Pour les acides fulviques et humiques, dont la teneur en cendres minérales est faible, JOCTEUR-MONROZIER et ANDREUX (1981) considèrent la production d'ammoniaque comme un indice d'instabilité chimique. Celle-ci est systématiquement plus élevée pour les acides fulviques. Par ailleurs, certains produits de réaction de condensation sont susceptibles de se décomposer en produisant de l'ammoniaque au cours de l'hydrolyse acide ; c'est le cas pour les produits de réaction des amino-acides avec des phénols (HAIDER *et al.*, 1965) et pour les nitroso-phénols, composés responsables du blocage de la nitrification et, vraisemblablement, de l'accumulation d'azote dans certains sols humifères et andiques (BOUDOT, 1982).

L'humification s'accompagne de la réorganisation de l'azote biomoléculaire avec accroissement, tout d'abord, des formes non identifiées, puis des formes non hydrolysables (KAI *et al.*, 1973 ; STEVENSON, 1982 ; JOCTEUR-MONROZIER et DUCHAUFOUR, 1986 ; CALDERONI et SCHNITZER (1984). Dans les fractions du sol étudié, la teneur en azote non identifié tend à augmenter avec l'azote hydrolysable. Ceci va dans le sens de la proposition de JOCTEUR-MONROZIER (1984) : *"la résistance à l'hydrolyse résulterait de l'incorporation des formes non identifiées dans un nucleus difficilement hydrolysable"*. Les acides humiques concentrent préférentiellement l'azote hydrolysable non identifié, mais ce sont les colloïdes organo-minéraux (COM) qui semblent contenir les constituants les plus condensés, car, bien que contenant relativement moins d'azote non identifié, la part de l'azote non hydrolysable est plus importante que dans les autres fractions. Par ailleurs, l'augmentation des formes d'azote non hydrolysable dans le sens : *acides humiques pH 12 < acides humiques pH 10 < colloïdes organo-minéraux*, s'accompagne d'une incorporation plus intime des fractions minérales, avec formation de complexes stables.

La synthèse de l'ensemble des résultats permet de classer les différentes fractions selon une évolution ou une stabilisation croissante dans le sens : *acides fulviques < colloïdes*

alumineux < colloïdes ferriques < acides humiques < colloïdes organo-minéraux < humine argileuse.

L'évolution de l'azote organique du sol est un révélateur de l'évolution des composés humiques. Dans ce sol, deux processus complémentaires ont lieu : une polycondensation oxydative et une stabilisation accompagnée de l'incorporation intime des constituants organiques et minéraux pour former des complexes organo-minéraux stables. Ceci se traduit par l'augmentation du taux d'azote non hydrolysable et de la longueur et de la résistance des chaînes hydrolysables. Parallèlement, les teneurs en azote α-aminé diminuent et celles en azote ammoniacal augmentent. La formation de complexes organo-minéraux est plus marquée dans l'horizon de surface (A12). Elle fait intervenir des mécanismes de polycondensation donnant naissance à des composés humiques qui vont évoluer en association avec le fer, l'aluminium et les argiles, et qui confèrent au sol un caractère typique de sol brunifié.

Reçu pour publication : Février 1990
Accepté pour publication : Juillet 1990

BIBLIOGRAPHIE

ANDREUX F., BRUCKERT S., CORREA A. et SOUCHIER B., 1980. – Sur une méthode de fractionnement physique et chimique des agrégats des sols : origines possibles de la matière organique des fractions obtenues. *C.R. Acad. Sci. Paris,* **291 D**, 381-384.

ANDREUX F., METCHE M. et JACQUIN F., 1971. – Incorporation de l'azote aminé dans la phytomélanine issue de la polymérisation oxydative de l'α-hydrojuglone. *C.R. Acad. Sc. Paris,* **272 D**, 2729-2731.

ARCHIBALD A.R., COAPES H.E. & STAFFORD G.H., 1969. – The action of dilute alkali on bacterial cell walls. *Biochem. J.*, **113**, 899-900.

BARRIUSO E., PORTAL J.-M. et ANDREUX F., 1987. – Cinétique et mécanisme de l'hydrolyse acide de la matière organique d'un sol humifère de montagne. *Can. J. Soil Sci.*, **67**, 647-658.

BARRIUSO E., PORTAL J.-M., FAIVRE P. et ANDREUX F., 1984. – Séparation des composés humiques et des associations organo-minérales d'un sol ocre humifère à structure microagrégée : influence du pH des réactifs d'extraction. *Pédologie,* Gand, **XXXIV**, 257-274.

BARRIUSO E., ANDREUX F. et PORTAL J.-M., 1985. – Quantification des acides humiques et fulviques d'un sol acide de montagne. Discussion méthodologique. *Science du Sol,* **23**, 23-25.

BOUDOT J.-P., 1982. – *Relation entre l'altération minérale et le cycle de l'azote sur matériel chloriteux du massif schisto-grauwackeux vosgien.* Thèse Doct. Etat, Univ. Nancy I, 168 p.

BREMNER J.-M., 1965. – Organic nitrogen in soils, *in : Soil Nitrogen,* W.V. Bartholomew & F.E. Clarks eds. Amer. Soc. Agron. Publ., Madison, Wis, 93-149.

BRUCKERT S. et KILBERTUS G., 1980. – Fractionnement et analyse des complexes organo-minéraux de sols bruns et de chernozems. *Plant & Soil,* **57**, 271-295.

BUTLER J.H.A. & LADD J.N., 1969. – Effect of extractant and molecular size on the optical and chemical properties of humic acids. *Austr. J. Soil Res.,* **7**, 229-239.

CHASSIN P., 1979. – Hypothèse sur la structure du complexe argilo-humique. Conséquence sur les processus d'humification. *Science du Sol,* **4**, 323-332.

CALDERONI G. & SCHNITZER M., 1984. – Nitrogen distribution as a function of radiocarbon age in paleosol humic acids. *Org. Geochem.*, **5**, 203-209.

DUCHAUFOUR Ph., 1983. – *Pédologie.* I. Pédogenèse et classification. Masson, Paris, 2e éd., 491 p.

ELSON L.A. & MORGAN W.J., 1933. – A colorimetric method of determination of glucosamine and chondrosamine, *Biochem. J.*, **27**, 1824-1828.
HAIDER K., FREDERICK L.-R. & FLAIG W., 1965. – Reactions between amino-acid compounds and phenols during oxidation. *Plant & Soil*, **22**, 49-64.
JAMES L.-B., 1972. – Amino-acid analysis : the humin problem. *J. Chromat.*, **68**, 123-130.
JANEL Ph., JOCTEUR-MONROZIER L. et TOUTAIN F., 1979. – Caractérisation de l'azote des litières et des sols par hydrolyse acide. *Soil Biol. Biochem.*, **11**, 141-146.
JOCTEUR-MONROZIER L., 1984. – *Nature et évolution de l'azote organique dans les sols et les sédiments marins récents*. Thèse Doct. Etat, Univ. Nancy I, 176 p.
JOCTEUR-MONROZIER L. et DUCHAUFOUR Ph., 1986. – Données récentes sur l'humification. *Science du Sol*, **24**, 377-388.
JOCTEUR-MONROZIER L. et ANDREUX F., 1981. – L'azote organique des sols. Exemples de quantification des formes protéiques et des combinaisons complexes. *Science du Sol*, **3**, 219-242.
KAI H., AHMAD Z. & HARADA T., 1973. – Factors affecting immobilization and release of nitrogen in soil and chemical characteristics of the nitrogen newly immobilized. *Soil Sci. Plant Nutr.*, **19**, 275-286.
LOWE L.E., 1973. – Amino-acid distribution in forest humus layers in British Columbia. *Soil Sci. Soc. Am. Proc.*, **37**, 569-572.
MARUMOTO T., FURUKAWA K., YOSHIDA T., KAI H., YAMADA Y & HARADA T., 1974. – Contribution of microbial cells and their cell-walls to the accumulation of soil organic matter decomposable on drying. I. Changes in the contents of individual amino-acids and amino-sugars in the organic nitrogen fraction as a result of the decomposition of applied ryegrass residues. *J. Sci. Soil and Manure*, **45**, 23-28. Résumé *In : Soil Sci. Plant. Nutr.*, **21**, 80-81.
MOORE S. & STEIN W.H., 1954. – A modified ninhydrin reagent for the photometric determination of amino-acids and related compounds. *J. Biol. Chem.*, 211, 907-913.
PARSONS J.W. & TINSLEY J., 1975. – Nitrogenous substances. *In : Soil Components*. I. Organic components. J.E. Gieseking ed., Springer Verlag Publ., Berlin, 263-304.
SCHLEIFER K.H. & KANDLER O., 1972. – Peptidoglycan types of bacterial cell-walls and their taxonomic implications. *Bacteriol. Rev.*, **36**, 407-477.
STEVENSON F.J., 1982. – Organic forms of soil nitrogen. *In : Nitrogen in agricultural soils*, F.J. Stevenson ed., Amer. Soc. Agron. Publ., Madison, Wisconsin, 67-122.
WAGNER G.H. & MUTATKAR V.K., 1968. - Amino components of soil organic matter formed during humification of ^{14}C-glucose. *Soil Sci. Soc. Am. Proc.*, **32**, 683-686.